

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN GENÉTICA, FÍSICA Y QUÍMICA FORENSE

# ANÁLISIS TEÓRICO Y EXPERIMENTAL DE EXTRACCIONES EN FASE SÓLIDA APLICADAS A CANNABINOIDES SINTÉTICOS

JULIA PORTELA PINO

TUTORES

IVÁN ÁLVAREZ FREIRE (USC)  
ÁNGELES PEÑA GALLEGO (UVIGO)  
JOAN FERRÉ QUERALT (URV)

JUNIO 2022

## **RESUMEN**

Las investigaciones en las que se realizan simultáneamente un análisis teórico y un análisis experimental permiten estudiar una hipótesis de partida con mayor profundidad. En este trabajo se realiza, paralelamente, un análisis teórico y experimental para determinar entre tres cartuchos de extracción en fase sólida cual es el más válido para extraer tres cannabinoides sintéticos de la muestra de plasma: el CP47,497, el CP55,940 y el JWH-073. A nivel teórico, se realiza un estudio de las energías de interacción aplicando el método del funcional de densidad (DFT) entre los monómeros que conforman los cartuchos de SPE y los cannabinoides sintéticos probando diferentes posibilidades de interacciones. A nivel experimental, se optimiza un método cromatográfico para poder detectar y cuantificar los cannabinoides. Posteriormente, se diseñan y optimizan los protocolos de extracción de las SPE para poder realizar un tratamiento de muestra acorde con las características de los cannabinoides. Se elaboran tres rectas de calibrado, una por cartucho, y se calcula el rendimiento de cada tipo de extracción. Mediante las dos vías de análisis se llega a la conclusión de que el mejor cartucho de extracción es el OASIS MCX.

Palabras clave: Cannabinoide sintético (CS), Extracción en Fase Sólida (SPE), funcional, funciones base, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

## **ABSTRACT**

The investigations in which a theoretical and an experimental analysis are carried out simultaneously allow us to delve into a starting hypothesis. In this work, a theoretical and experimental analysis is carried out in parallel to determine which of the three solid phase extraction cartridges is the most valid to extract three synthetic cannabinoids from a plasma sample: CP47.497, CP55.940 and JWH-073. At a theoretical level, a study of the interaction energies is carried out by applying the density functional theory (DFT) between the monomers that make up the SPE cartridges and the synthetic cannabinoids, testing different interaction possibilities. At the experimental level, a chromatographic method is optimized to detect and quantify cannabinoids. Subsequently, SPE extraction protocols are designed and optimized to treat the sample according to the characteristics of the cannabinoids. Three calibration curves are made, one for each cartridge, and the extraction performance of each one is calculated. Using both methods of analysis, it is concluded that the best extraction cartridge is the OASIS MCX.

Key words: Synthetic Cannabinoid (SC), Solid Phase Extraction (SPE), functional, basis sets, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCION .....	4
1.  CANNABINOIDES SINTÉTICOS: CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES.....	4
2.  TRATAMIENTO DE MUESTRA: EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) .....	5
3.  TÉCNICA INSTRUMENTAL: CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS) .....	6
OBJETIVOS .....	9
METODOLOGIA. PARTE TEÓRICA .....	9
TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD. FUNCIONALES Y FUNCIONES BASE.....	9
METODOLOGÍA. PARTE EXPERIMENTAL.....	12
MEDIOS EXPERIMENTALES.....	12
REACTIVOS.....	12
DISOLUCIONES.....	13
INTRUMENTACIÓN .....	13
MATERIAL .....	13
HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.....	13
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	14
PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN.....	14
IDENTIFICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES Y ELECCIÓN DEL PATRÓN INTERNO.....	15
TRATAMIENTO DE MUESTRA: EXTRACCIONES Y DERIVATIZACIÓN .....	16
ESTUDIO DE LA LINEALIDAD .....	16
IDENTIFICACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN (LOD) Y CUANTIFICACIÓN (LLOQ) .....	16
ELABORACIÓN DE LAS RECTAS DE CALIBRADO POR PATRONES INTERNOS.....	16
EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES .....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE TEÓRICA .....	18
ENERGÍAS DE INTERACCIÓN .....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
CONCLUSIONES .....	26
BIBLIOGRAFIA .....	27
ANEXOS.....	32

## **INTRODUCCION**

### **1. CANNABINOIDES SINTÉTICOS: CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES**

Los cannabinoides sintéticos (CS) son compuestos clasificados como nuevas drogas psicoactivas (NPS) que poseen una estructura y funcionalidad similar a la del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), el principal compuesto psicoactivo del cannabis.<sup>1,2</sup> Al igual que este, tienen la capacidad de producir efectos psicoactivos semejantes como: euforia, dismnesia o disminución de la sensación de dolor. Esta propiedad se debe a la unión de estos compuestos con los receptores CB-1 y CB-2 de los cannabinoides.<sup>3</sup> Mientras que los receptores CB-1 controlan los efectos psicoactivos y sedantes, los CB-2 controlan el sistema inmunológico y la respuesta al dolor.<sup>4,5</sup> Por ello, el objetivo que se persigue en la síntesis de estos compuestos ilícitos es que se unan específicamente al receptor CB-1. Sin embargo, a diferencia con el THC, el riesgo de padecer una sobredosis es mucho más elevado, ya que los cannabinoides sintéticos poseen una mayor potencia en comparación con el cannabis.<sup>4</sup>

Comercialmente, son de fácil obtención vía Internet y muy atractivos para los consumidores, sobre todo para los más jóvenes, ya que la consideran una alternativa más segura y legal. Se pueden encontrar bajo el nombre de “Spice”, “K2” o “Herbal Incense” y consisten en mezclas de hierbas disponibles lícitamente en el mercado que son rociadas con estas sustancias para simular los efectos del THC y así poder ser consumidas mediante la combustión e inhalación en cigarrillos.<sup>6,7</sup> Para poder esconder su verdadera finalidad y, de esta forma, evitar una supervisión reglamentaria, se pueden encontrar con avisos de que su uso es exclusivo para aromaterapia o para utilizar como inciensos. Debido a la variación y la complejidad de las mezclas de hierbas y a su falta de homogenización, puesto que se desconocen las diferentes proporciones de CS añadidos, es difícil predecir los efectos que causan en el ser humano después de su consumo.<sup>1</sup> Actualmente, aún se sabe muy poco acerca de la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) y farmacodinámica de los CS. Teniendo en cuenta el nivel de potencia que tienen actuando sobre el sistema nervioso central, muchos de ellos se han estudiado como compuestos farmacológicamente activos, pero todavía se no se conocen cuáles son las dosis letales.<sup>9</sup>

En los últimos años el uso recreativo de este tipo de NPS ha ido creciendo en popularidad de forma acelerada. Según el informe Mundial sobre las drogas de 2019, entre los años 2007 y 2017 ha habido un aumento considerable de las incautaciones mundiales de cannabinoides sintéticos tipo “Spice”, sobre todo en los años 2012, 2014 y 2017.<sup>8</sup> A nivel europeo, de todas las NPS, los CS junto con las catinonas son las drogas más comúnmente identificadas.<sup>9</sup> Esto nos muestra explícitamente

que los cannabinoides sintéticos son un importante peligro para la salud humana y representan una nueva clase de droga de abuso que se encuentra en pleno auge, sobre todo en casos de sumisión química.

Para este trabajo se han elegido tres CS: el CP47,497 (5-(1,1-dimetilheptil)-2-[(1R,3S)-3-hidroxiciclohexilo]-fenol), el CP55,940 ([(-)-Cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)-fenil]-trans-4-(3-hidroxi propil) ciclohexanol]), (ambos compuestos bicíclicos formados por un anillo aromático unido a un ciclohexilfenol), y el JWH-073 (1-butyl-3-(1-naftoil)-indol), perteneciente al grupo de los aminoalquilondoles (AAIs) ya que posee un grupo heterocíclico indol.<sup>10</sup> Los tres son cannabinoides que se pueden sintetizar de manera sencilla y con materiales que están fácilmente disponibles.

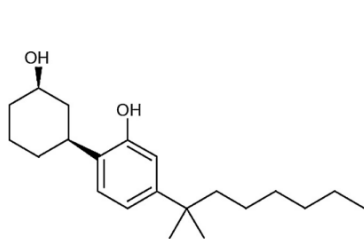


Figura 1: CP47,497.

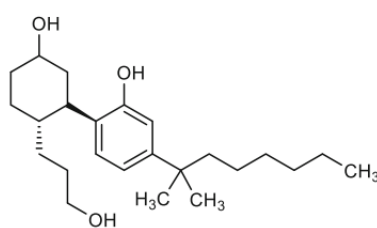


Figura 2: CP55,940.

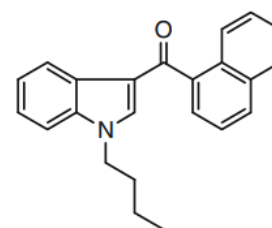


Figura 3: JWH-073.

## 2. TRATAMIENTO DE MUESTRA: EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica empleada en el tratamiento de muestra para el aislamiento de los analitos en estudio que se encuentran en una matriz. El proceso de extracción consiste en acondicionar una fase sólida (sorbente) contenida en un cartucho y, a continuación, transferir los analitos, donde se retienen durante el proceso de carga de la muestra. Posteriormente, la fase sólida se lava para eliminar las posibles interferencias que puedan quedar retenidas y los analitos se recuperan por elución.<sup>11</sup> Un factor importante en la SPE es que los analitos a extraer deben de tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra, para que queden bien retenidas en el sorbente. Esto implica que la elección de un buen sorbente tiene mucha importancia, porque su elección controla parámetros como la selectividad, la afinidad y la capacidad de la SPE. Para escoger la fase sólida más idónea se deben de tener en cuenta las características de los analitos de interés y las interacciones del sorbente elegido con los grupos funcionales de los analitos. Sin embargo, otros factores a considerar son el tipo de matriz de la muestra y sus interacciones, tanto con el sorbente como con los analitos.<sup>12</sup> Los principales objetivos de la SPE son: la preconcentración de los analitos, la limpieza de la muestra y la transferencia de la muestra a un disolvente diferente del que se encontraba inicialmente.

La SPE se desarrolló inicialmente como complemento de la extracción líquido-líquido (LLE) debido a la necesidad de disminuir el uso de disolventes orgánicos.<sup>13</sup> En la actualidad es la técnica de extracción más habitual en muchos ámbitos de la química. Los sorbentes de las SPE se pueden clasificar en diferentes grupos dependiendo del tipo de sustancias que conformen el cartucho de extracción: cartuchos de sílica modificada, de carácter iónico, de base de carbono, de base polimérica y sorbentes selectivos.<sup>11</sup> Para este trabajo se escogieron tres tipos de cartuchos con distintos sorbentes:

- **Cartuchos de sílica modificada C18:** Son sorbentes conocidos como de fase reversa que contienen grupos poliméricos de sílica unidos a cadenas de grupos funcionales octadecilo (C18). Es el material más común para la fabricación de cartuchos. Sus mecanismos de interacción con el analito son principalmente interacciones hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waals. Presentan como ventaja que no retienen interferencias, aunque como inconvenientes obtienen baja recuperación en la extracción de compuestos polares e inestabilidad a pH extremos.<sup>12</sup>
- **Cartuchos de base polimérica modificada:** Son sorbentes formados por polímeros macroporosos de poli-divinilbenceno combinado con grupos funcionales de vinilpirrolidona. Son bases poliméricas de estructura hidrofóbica y son estables en todo el rango de pH.<sup>11</sup> Las interacciones que pueden presentar con los analitos son fuerzas de Van der Waals, interacciones pi-pi gracias a la aromaticidad del divinilbenceno y de puentes de hidrógeno debido al grupo pirrolidona.<sup>13</sup>
- **Cartuchos de base polimérica de intercambio catiónico:** La estructura polimérica de los sorbentes de estos cartuchos está formada por una base de polímeros de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona pero, a diferencia con los cartuchos anteriores, está modificada químicamente, ya que contiene grupos de ácido sulfónico que le permiten retener cationes. La principal ventaja de estos cartuchos es que permiten retener un amplio espectro de analitos tanto polares como apolares gracias a las interacciones generadas, como son enlaces de hidrógeno y de carácter dipolar.<sup>14,15</sup>

### **3. TÉCNICA INSTRUMENTAL: CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)**

La GC-MS es una combinación de dos técnicas analíticas: la cromatografía de gases (GC), que separa los elementos contenidos en mezclas heterogéneas; y la espectrometría de masas, que

proporciona información para la identificación de las estructuras de estos analitos. Describiéndolas más en profundidad, la cromatografía de gases es un método de separación física en el que los componentes de una mezcla se distribuyen selectivamente entre una fase móvil, que es un gas portador inerte, y una fase estacionaria, contenida en el interior de una columna cromatográfica. Inicialmente, la muestra es introducida en un inyector que se encuentra a altas temperaturas, y se volatiliza. Seguidamente, se produce la separación de los componentes de la mezcla en la columna. El gas portador, que suele ser hidrógeno o helio, transfiere la muestra a través de la columna hasta el detector o, en este caso para GC-MS, hasta el espectrómetro de masas. La separación de los analitos se debe a las diferencias en los coeficientes de distribución de cada componente entre la fase móvil y la fase estacionaria, es decir, los analitos sufren repetidos fenómenos de absorción y desorción durante su recorrido por la fase estacionaria. Al ser un método de separación en fase gaseosa, una característica fundamental que tienen que cumplir los analitos es que deben de tener suficiente volatilidad y estabilidad térmica.<sup>16,17</sup>

En cuanto a la espectrometría de masas (MS), es una técnica en la que se generan iones en fase gaseosa que posteriormente se clasifican según su relación masa-carga ( $m/z$ ) para su detección. En el espectro de masas resultante se pueden observar un gráfico donde se recogen las abundancias relativas de los iones generados en función de la relación  $m/z$ . La MS se puede dividir en cinco etapas: introducción e ionización de la muestra, análisis de masas, detección de los iones generados y tratamiento de los datos. Todos los espectrómetros de masas poseen un control informático total de todas las partes.<sup>18,19</sup> Según el tipo de información que se quiera obtener, la MS tiene dos modalidades de trabajo o de adquisición de datos: el modo barrido completo (full scan) y el modo monitorización selectiva de iones (SIM). En el modo full scan se realiza un barrido, dentro de un intervalo de valores  $m/z$ , y se obtiene un espectro de masas que recoge las abundancias de iones dentro de ese rango de  $m/z$ . En el modo SIM el analizador de masas realiza una medición de la abundancia de iones con valores concretos de  $m/z$ , pudiendo saltar de un valor a otro pasando un tiempo de análisis previamente especificado en cada ion para medir su abundancia. Es decir, el modo SIM posee un elevado nivel de sensibilidad en comparación con full scan, sin embargo, se pierde información acerca de todos los componentes que puede contener la muestra.<sup>17</sup>

Para los sistemas GC-MS la introducción de la muestra del cromatógrafo al espectrómetro se realiza a partir de la columna cromatográfica, gracias a un adecuado acoplamiento denominado

interfase. La ionización de los analitos se realiza generalmente por ionización electrónica (EI) o química (CI), aunque la más utilizada en la GC-MS es la EI. Consiste en el desarrollo de un proceso muy energético en el que se originan iones moleculares ( $M^{+}$ ) que tienen una gran cantidad de energía y la liberan fragmentándose para alcanzar estados de energía más bajos, lo que da lugar a los espectros de masas con múltiples picos de  $m/z$ . Es importante destacar que para esta técnica es necesario que la ionización de los analitos, el análisis de masas y la detección de los iones tengan lugar en un sistema de alto vacío. Para este trabajo se empleó un sistema GC-MS formado por un ionizador de impacto electrónico, un analizador de masas cuadrupolo (QMS) y un electromultiplicador como detector de iones.<sup>20</sup>

## OBJETIVOS

Como objetivos generales de este trabajo se pretende realizar un estudio teórico-computacional de las energías de interacción entre los monómeros que conforman los cartuchos de tres extracciones en fase sólida distintas y tres cannabinoides sintéticos: el JWH-073, el CP-47,947 y el CP55,940; comparar los resultados obtenidos con los recogidos en un estudio experimental, e identificar que extracción es la más óptima para cada cannabinoide a partir de los diferentes datos conseguidos por ambas vías. Como objetivos específicos de este trabajo se indican los siguientes. A nivel teórico:

- Dibujar las moléculas de los monómeros que conforman los cartuchos de extracción y los cannabinoides para la realización del cálculo de sus energías mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT).
- Estudiar las energías de interacción entre el monómero y los cannabinoides para esclarecer si los cartuchos seleccionados son los óptimos para realizar la extracción o no y determinar los cannabinoides.
- Comparar distintos funcionales del DFT para observar sus principales propiedades y diferencias entre ellos para seleccionar el más idóneo para la realización de este tipo de estudios.

A nivel experimental:

- Optimizar un método cromatográfico para separar y cuantificar los cannabinoides sintéticos.
- Optimizar los métodos de extracción en fase sólida para los cartuchos seleccionados.
- Aplicar esos métodos optimizados a muestras de plasma dopadas con los cannabinoides.

## METODOLOGIA. PARTE TEÓRICA

### TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD. FUNCIONALES Y FUNCIONES BASE

A la hora de llevar a cabo el estudio un sistema molecular y poder así deducir su energía y sus propiedades electrónicas, se ha de resolver la ecuación de Shrödinger:<sup>21,22</sup>

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (1)$$

En donde  $\hat{H}$  es el operador hamiltoniano,  $\psi$  una función de onda que describe el sistema y  $E$  la energía asociada a ese sistema. A su vez, el operador hamiltoniano también puede describirse como:

$$\hat{H} = T^n + T^e + V^{en} + V^{ee} + V^{nn} \quad (2)$$

Siendo  $T^n$  y  $T^e$  las terminaciones que corresponden a la energía cinética de los núcleos y electrones, respectivamente,  $V^{en}$  representa la energía potencial de atracción entre electrones y núcleos y  $V^{ee}$  y  $V^{nn}$  representan la energía de repulsión de los electrones entre sí y entre los núcleos, respectivamente.<sup>21-23</sup> A lo largo de los años se han ido desarrollando diferentes métodos y teorías para poder resolver esta ecuación y así poder estudiar las propiedades de un sistema en estudio. En la actualidad, la teoría más utilizada es la teoría del funcional de la densidad (DFT). La DFT es un método variacional que, a diferencia de otros métodos mecano-cuánticos obtiene la energía de un sistema a partir de la densidad electrónica y no a partir de funciones de onda, como ocurre en el método Hartree Fock (HF). La DFT fue desarrollada a partir de los teoremas de Hohenberg y Kohn (1964) y posteriormente por el método de Kohn Sham.<sup>24,25</sup>

Inicialmente, en los métodos DFT un sistema molecular tiene que estar definido por su potencial externo ( $v(r)$ ) y por un número  $N$  de electrones, los cuales vienen determinados por la densidad electrónica, es decir:  $N = \int \rho(r) dr$ . El primer teorema de Hohenberg y Kohn describe primeramente que la energía viene determinada por la densidad electrónica del estado fundamental,  $E_0 = E_0(\rho_0)$ , por lo que se puede afirmar que la energía es un funcional de la densidad electrónica del estado fundamental. Además, para este primer teorema se establece que no pueden coexistir dos sistemas diferentes que posean la misma densidad electrónica en el estado fundamental ( $\rho_0$ ) (no puede haber dos potenciales externos ( $v(r)$ ) con la misma  $\rho$ ) y describe la energía como:

$$E_0 = E_v(\rho_0) = \int \rho_0(r) v(r) dr + F[\rho_0] \quad (3)$$

En donde  $F[\rho_0]$  es el funcional de Hohenberg-Kohn, el cual es: desconocido, independiente a  $v(r)$  y se define como  $F[\rho_0] = T[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0]$ , donde  $T$  y  $V_{ee}$  son los términos de energía cinética y repulsión electrónica, respectivamente. El segundo teorema de Hohenberg y Kohn establece un principio variacional, en el que confirma que  $E_v[\rho_0] \leq E_v[\rho]$ , siendo  $\rho_0$  la densidad electrónica del estado fundamental y  $\rho$  una densidad electrónica que debe de ser mayor o igual que cero ( $\rho(r) \geq 0$ ). Sin embargo, los teoremas de Hohenberg y Kohn no solventan el problema de construir el funcional  $F[\rho_0]$ . Por ello, el método de Kohn-Sham toma como referencia un sistema de  $N$  electrones que se estudian como partículas independientes, es decir, es un sistema no interactuante y establece que la densidad del estado fundamental es la misma que la del sistema real ( $\rho_s = \rho_0$ ), por lo que la densidad electrónica se escribe como:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N |\psi_i(r)|^2 \quad (4)$$

Siendo  $\psi_i$  las funciones de onda que representan el sistema. Gracias a este método, se puede llegar a describir una nueva fórmula de la energía de un sistema:

$$E[\rho] = T_s + J[\rho] + E_{xc}[\rho] + \int \rho(r) v(r) dr \quad (5)$$

Siendo  $T_s$  la energía cinética de los electrones independientes en el sistema real,  $J[\rho]$  un término que representan la repulsión electrónica de Coulomb y  $E_{xc}$  es el funcional de correlación e intercambio, que a su vez este se puede definir como la suma de la diferencia entre las energías cinéticas del sistema real y del sistema de referencia y la diferencia entre la repulsión bielectrónica y la repulsión de Coulomb ( $E_{xc}[\rho] = (T[\rho] - T_s[\rho]) + (V_{ee}[\rho] - J[\rho])$ ).<sup>21-25</sup>

A la hora de elegir un funcional para el estudio de nuestro sistema molecular hay que tener en cuenta que existen de varios tipos, y la elección del más apto dependerá del tipo de sistema que se analice y de los resultados que se quieren obtener. En este trabajo se utilizan los funcionales B3LYP y el M06-2X, ambos funcionales híbridos, que tienen como característica incluir un pequeño porcentaje de intercambio Hartree Fock (HF). El funcional B3LYP es de los más utilizados, además de aportar un 20% de intercambio HF.<sup>26</sup> Por otro lado, el funcional M06-2X además de ser un funcional híbrido, es meta-GGA, un tipo de funcionales que poseen un mayor rendimiento, ya que realizan una corrección exhaustiva del gradiente de la densidad electrónica. Para realizar los cálculos computacionales, también se debe seleccionar la función base a emplear, que es el conjunto de funciones monoeléctricas empleadas para construir los orbitales moleculares. En este trabajo se han empleado las funciones 6-31G\*\* y la 6-311++G\*\*. En la primera, cada orbital atómico de capa interna se representa por una combinación lineal de seis gaussianas primitivas y para cada orbital de valencia se emplean dos funciones base, una combinación de dos primitivas gaussianas y una gaussiana difusa, añadiendo seis funciones de polarización tipo d a los átomos pesados y tres tipo p al hidrógeno. La segunda sería igual que la primera pero se añade una función gaussiana y un función difusa para el hidrógeno y para los átomos pesados.<sup>26</sup>

Por último, un factor importante que considerar en este trabajo es la energía de interacción que se genera entre el sorbente de los cartuchos de extracción y los cannabinoides en estudio, pues esta energía debe de ser lo suficientemente fuerte como para que los cannabinoides queden retenidos por el sorbente a la hora de cargar la muestra, pero debe de ser lo suficientemente débil

como para que se consiga producir la elución y se puedan recuperar para poder analizarlos. Para calcular la energía de interacción entre dos moléculas ( $E_{int}$ ) previamente ha de tenerse en cuenta el error de superposición de bases (BSSE). Este error se produce a partir del solapamiento de las funciones base de ambas moléculas cuando estas se aproximan la una a la otra para poder interactuar. Para corregirlo, se utiliza el método de Counterpoise, por lo que la ecuación de la energía de interacción quedaría tal que así:<sup>25</sup>

$$E_{int} = E_{AB} - \left( E_A^{(AB)} + E_B^{(AB)} \right) \quad (6)$$

Siendo A y B dos moléculas que conforman el sistema en estudio,  $E_{AB}$  es la energía del complejo molecular y  $E_A^{(AB)}$  y  $E_B^{(AB)}$  son las energías de cada molécula por separado dentro de la geometría del sistema formado. Para este cálculo también será necesario tener en cuenta la BSSE.<sup>22</sup>

En este trabajo, para calcular la  $E_{int}$  de los complejos formados se utilizan como funcionales el B3LYP y el M06-2X (ambos funcionales híbridos) y como funciones base se utilizan la 6-31\*\*G y la 6-311++G\*\*.<sup>27-29</sup>

## **METODOLOGÍA. PARTE EXPERIMENTAL**

### **MEDIOS EXPERIMENTALES**

#### **REACTIVOS**

- Patrón CP47,497: Líquido. Cayman Chemical Company®
- Patrón JWH-073: Sólido. THC Pharm®, (Alemania)
- Patrón CP55,497: Sólido. Cayman Chemical Company®
- Patrón interno THC-COOH D3: 11-nor-9-carboxy-delta9-THC-D3, 100 µg/ml. Cerilliant
- Acetonitrilo hipergraduado para LC-MS LiChrosolv®, Supelco (Alemania)
- Metanol de alta pureza (≥99,8%) para GC, Sigma-Aldrich (Polonia)
- Acetato de Etilo de alta pureza (≥99,5%) para GC, Sigma-Aldrich (Francia)
- 2-Propanol gradient grade para cromatografía de líquidos, LiChrosolv®, Merck (Alemania)
- HCl (ácido clorhídrico) Concentrado, Sharlau, S.A.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (dihidrógeno fosfato de potasio), Merck (Alemania)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (hidrógeno fosfato de potasio trihidratado), Merck (Alemania)
- BSTFA (Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) para cromatografía de gases, Merck
- TMCS (Clorotrimetilsilano) para cromatografía de gases, Merck

## **DISOLUCIONES**

- HCl diluído 0.5M
- Disolución tampón fosfato a pH 6
- TCMS/BSTFA 1:99 (v/v)
- Agua acidificada con HCl diluído hasta pH 2.5
- MeOH/H<sub>2</sub>O 20:80 (v/v)
- MeOH/AcEt 50:50 (v/v)
- Disolución tampón fosfato/Acetonitrilo 70:30 (v/v)
- AcEt/Alcohol isopropílico 85:15 (v/v)

## **INTRUMENTACIÓN**

- Centrífuga Minicen Orto Alresa
- Estufa Universal de aire forzado Memmert
- PHmetro de Sobremesa XS pH8+DHS®
- Termostato de bloque metálico VLM EC1
- Agitador Vortex
- Balanza analítica Denver Instrument
- Manifold de Extracción Waters®, Milford, Masechusetts
- Cromatógrafo de gases (GC system), HP 6890 Series, Hp Hewlett Packard, Alemania
- Inyector 7683B Series, Agilent Technologies
- Espectrómetro de masas (Mass Selective Detector), 5973Network, Agilent

## **MATERIAL**

- Cartuchos de Extracción Strata™-X 33µm de fase Reversa, 60mg/3ml, Phenomenex®
- Cartuchos de Extracción Strata® C18-T (55µm, 140Å), 200mg/3mL, Phenomenex®
- Cartuchos de Extracción OASIS® MCX 1cc (30mg) Waters®
- Parafilm®
- Tubos de vidrio de fondo cónico con esmerilado, tubos de vidrio de fondo redondo, tubos de microcentrífuga (Eppendorfs), micropipetas de 1000, 200 y 100µL, vasos de precipitados, frascos lavadores, gradillas metálicas

## **HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS**

- Software Gaussian 09
- Software de hojas de cálculo Microsoft Excel

- Software Statgraphics Centurion 18

## **CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

### **🚦 Programa de Temperaturas del horno**

- Temperatura inicial: 100°C con un tiempo inicial de 1 minuto
- Temperatura final: 300°C con un tiempo final de 5 minutos
- Temperatura máxima: 350°C
- Rampas:

*Tabla 1: Intervalos de temperaturas del horno (Rampas) con las temperaturas de iniciales y finales con el tiempo que se mantiene la temperatura final.*

Rampas	Temperatura inicial	Temperatura final	Tiempo final
30°C/min	100°C	260°C	1 minuto
10°C/min	260°C	300°C	10 minutos

- Tiempo de equilibrio: 0.50 minutos
- Tiempo total: 21.33 minutos

### **🚦 Inyector**

- Modo de inyección: Splitless
- Volumen de inyección: 1µL
- Temperatura inicial del inyector: 240°C

### **🚦 Columna**

- Tipo de columna: Agilent 19091S-133U
- Flujo Inicial: 1.0mL/min
- Gas portador: Helio

### **🚦 Línea de transferencia (MSD Transfer Line Heater)**

- Temperatura de transferencia: 280°C

## **PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN**

### **🚦 Protocolo de Extracción para los cartuchos Phenomenex STRATA X**

- Acondicionado: Se añade 1mL de MeOH y 1mL de Agua MiliQ acidificada a pH 2
- Carga: Se carga con 500µL de muestra
- Lavado: Se añaden 500µL de Agua Acidificada a pH 2
- Elución: Se añade 1ml de MeOH y a continuación 1ml de una disolución de MeOH/AcEt en proporciones 50:50 (v/v)

### 🚦 Protocolo de Extracción para los cartuchos Phenomenex Strata C18-T

- Acondicionado: Se añade 1ml de una disolución de MeOH/H<sub>2</sub>O en proporciones 20:80 (v/v)
- Carga: Se carga con 500µL de muestra
- Lavado: Se añaden 500µL de MeOH/H<sub>2</sub>O en proporciones 20:80 (v/v)
- Elución: Se añaden 500µL MeOH

### 🚦 Protocolo de Extracción para los cartuchos OASIS MCX

- Acondicionado: Se añaden 250µL de MeOH y 250µL de Agua MiliQ acidificada a pH2
- Carga: Se carga con 500µL de muestra
- Lavado: Se añaden 250µL de tampón fosfato a pH 6 y 250µL de una disolución de tampón fosfato a pH 6 y Acetonitrilo, en proporciones 70:30 respectivamente (v/v)
- Elución: Se añaden 750µL de una disolución de AcEt y Alcohol Isopropílico (2-propanol) en proporciones 85:15 respectivamente (v/v)

## IDENTIFICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES Y ELECCIÓN DEL PATRÓN INTERNO

Primeramente, se estudian las características principales de los cannabinoides mediante una búsqueda bibliográfica exhaustiva. Con esto se averigua: cuales son los tiempos de retención para cada uno de ellos según las condiciones cromatográficas utilizadas; los espectros de masas y los iones propios de los CS; si es necesario llevar a cabo un proceso de derivatización para que sean detectados por GC-MS.<sup>5,10,30-36</sup> Posteriormente, se inyectan en el cromatógrafo disoluciones de 100ppm de cada cannabinoide y del THCCOOH-D3 (patrón interno) por individual en modo full Scan, para poder establecer los tiempos de retención de los compuestos en nuestras condiciones cromatográficas y así determinar cuáles serán los iones cualificadores y los cuantificadores. Seguidamente, se inyecta una mezcla de todos los compuestos en la misma concentración para comprobar que no interfieren unos con otros. Todos estos datos se recogen en la Tabla 2, confirmando en qué casos es necesaria la derivatización.

Tabla 2: Fenómenos de derivatización, tiempos de retención y iones característicos de cada cannabinoide para su cualificación y cuantificación junto con los del patrón interno.

CANNABINOIDES	DERIVATIZACIÓN	Tiempos de retención (tr)	Iones cualificadores (m/z)	Ión cuantificador (m/z)
CP47,497	SI	10,91	377,378,289	462
CP55,940	SI	13,23	73,327,305,419	219
JWH-073	NO	18,50	284,310,326,328	327
THC-COOH D3	SI	13,21	374,476,491	274

## **TRATAMIENTO DE MUESTRA: EXTRACCIONES Y DERIVATIZACIÓN**

Inicialmente, se procede a preparar disoluciones en metanol de los tres cannabinoides en estudio a partir de los patrones comerciales. Se empieza realizando disoluciones de concentración 1mg/ml de cada uno y, a partir de esta, se elaboran diluciones que contengan concentraciones de 100, 10 y 1 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cada cannabinoide por individual. Una vez hechas estas disoluciones, se prepara una disolución en metanol de 10ppm del patrón interno THC-COOH D3. A continuación, se centrifuga plasma humano a una velocidad de 14000rpm durante 5 minutos, con el objetivo de que precipiten las proteínas plasmáticas que puedan interferir en la extracción. Se cogen alícuotas de 500 $\mu\text{L}$  que se dopan con las concentraciones de los tres cannabinoides y del patrón interno. Se agitan las muestras en un vortex y se realizan las extracciones en fase sólida. Los extractos obtenidos se evaporan en un termostato a 40°C y con corriente de nitrógeno. Por último, se lleva a cabo la reacción de derivatización, añadiendo 40 $\mu\text{L}$  de la mezcla derivatizante (TCMS/BSTFA 1:99 (v/v)). Se vuelven a agitar las muestras en un vortex y se introducen en una estufa a 100°C durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se retiran de la estufa y se dejan enfriar, para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

## **ESTUDIO DE LA LINEALIDAD**

### **IDENTIFICACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN (LOD) Y CUANTIFICACIÓN (LLOQ)**

Consultando diferentes fuentes bibliográficas, teniendo en cuenta que el LOD tiene que ser superior a tres veces la relación señal/ruido y el LLOQ diez veces la ratio señal/ruido, se escogen valores de concentraciones de analito muy bajas para las condiciones cromatográficas optimizadas. Posteriormente, se van realizando análisis y se van disminuyendo cada vez más las concentraciones hasta que se lleguen a los valores de  $LOD = 3s_{bl}$  y  $LLOQ = 10s_{bl}$ , siendo  $s_{bl}$  la desviación estándar del blanco, es decir, una muestra que no contiene los analitos. A nivel práctico, se preparan disoluciones de los patrones de los cannabinoides en concentraciones decrecientes para fijar los límites.<sup>34,36,37</sup>

### **ELABORACIÓN DE LAS RECTAS DE CALIBRADO POR PATRONES INTERNOS**

A la hora de poder cuantificar y obtener las concentraciones de cannabinoides en una muestra de plasma se realizan tres rectas de calibrado, una por cada columna utilizada. A 8 tubos con plasma se le añaden concentraciones conocidas de los cannabinoides de manera ascendente en cada uno de ellos, y una concentración de 0,5ppm en los tubos de patrón interno. Las concentraciones de cada tubo de muestra se muestran en la tabla 3.

Después, se realizan las extracciones, se evapora el extracto obtenido y se derivatiza, finalizando con la inyección en el equipo cromatográfico.

Tabla 3: Concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  en cada tubo de muestra de los tres cannabinoides y del patrón interno.

PUNTOS	0	1	2	3	4	5	6	7
CP47,497	0	0,02	0,05	0,1	0,5	0,8	1	1,2
CP55,940	0	0,08	0,1	0,2	0,5	0,8	1	1,2
JWH-073	0	0,02	0,05	0,1	0,5	0,8	1	1,2
THC-COOH D3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

## EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

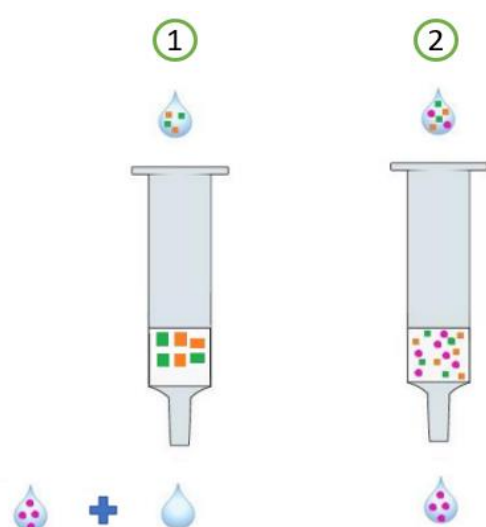


Figura 4: Esquema de los dos tipos de extracción. La extracción 1 se dopa con los cannabinoides una vez realizada la extracción, siendo las bolas rosas los cannabinoides. En la extracción 2 la muestra ya contiene los cannabinoides y se extraen, obteniendo los cannabinoides extraídos. Los cuadrados verdes y naranja serían sustancias interferentes.

Uno de los principales objetivos de este trabajo es saber cuál es el porcentaje de rendimiento, para así poder determinar qué tipo de extracción es la óptima con el fin de perder la menor cantidad posible de analito y ser capaz de realizar el tratamiento de muestra más acorde para este análisis. Por ello, se escoge un punto intermedio de la recta de calibrado y se llevan a cabo dos extracciones diferentes para cada cartucho: en una de ellas la muestra que se hace pasar por el cartucho contiene una concentración determinada de cannabinoides y de patrón interno, mientras que en la otra extracción la muestra se hace pasar por un cartucho que únicamente contiene una concentración

determinada de patrón interno y posteriormente, una vez realizada la extracción, se le añaden una concentración conocida de los cannabinoides. De esta manera, cuando esté hecho el análisis, el resultado obtenido para la muestra dopada después de preparar la extracción será una muestra donde se ha recuperado un 100% de los analitos y, sabiendo esto, se puede calcular cual es el porcentaje de rendimiento de extracción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE TEÓRICA

Todos los resultados recogidos de cálculos teóricos fueron obtenidos a partir del método DFT con el programa de cálculos cuánticos Gaussian 09. Los funcionales escogidos para realizar este tipo de cálculos han sido el B3LYP y el M06-2X, y como funciones base se han utilizado la 6-31G\*\*, la 6-311++G\*\* y la def2-TZVP, siendo esta última función base empleada únicamente para el estudio de las moléculas de los cannabinoides. Inicialmente, se realiza una optimización de las estructuras moleculares de los cannabinoides y de los monómeros de los sorbentes, por individual, para calcular la energía de cada estructura. Además, también se obtienen las frecuencias de vibración de las moléculas para asegurar que las estructuras optimizadas resultantes sean mínimos. Una vez conseguidas las estructuras optimizadas, se procede a la visualización en 3D de la densidad electrónica de las moléculas y a su estudio, con el fin de averiguar que tipos de interacciones se establecerán entre el cannabinoide y el monómero del sorbente. A continuación, se prosigue con el ensamblaje de los diferentes complejos moleculares monómero-cannabinoide, modelándolos de manera que las interacciones entre ambas moléculas sean diferentes entre los complejos formados. En las figuras 5 y 6 se pueden observar las diferentes estructuras de las moléculas en estudio: en la figura 5 están los CS y en la figura 6 los monómeros que conforman los sorbentes de

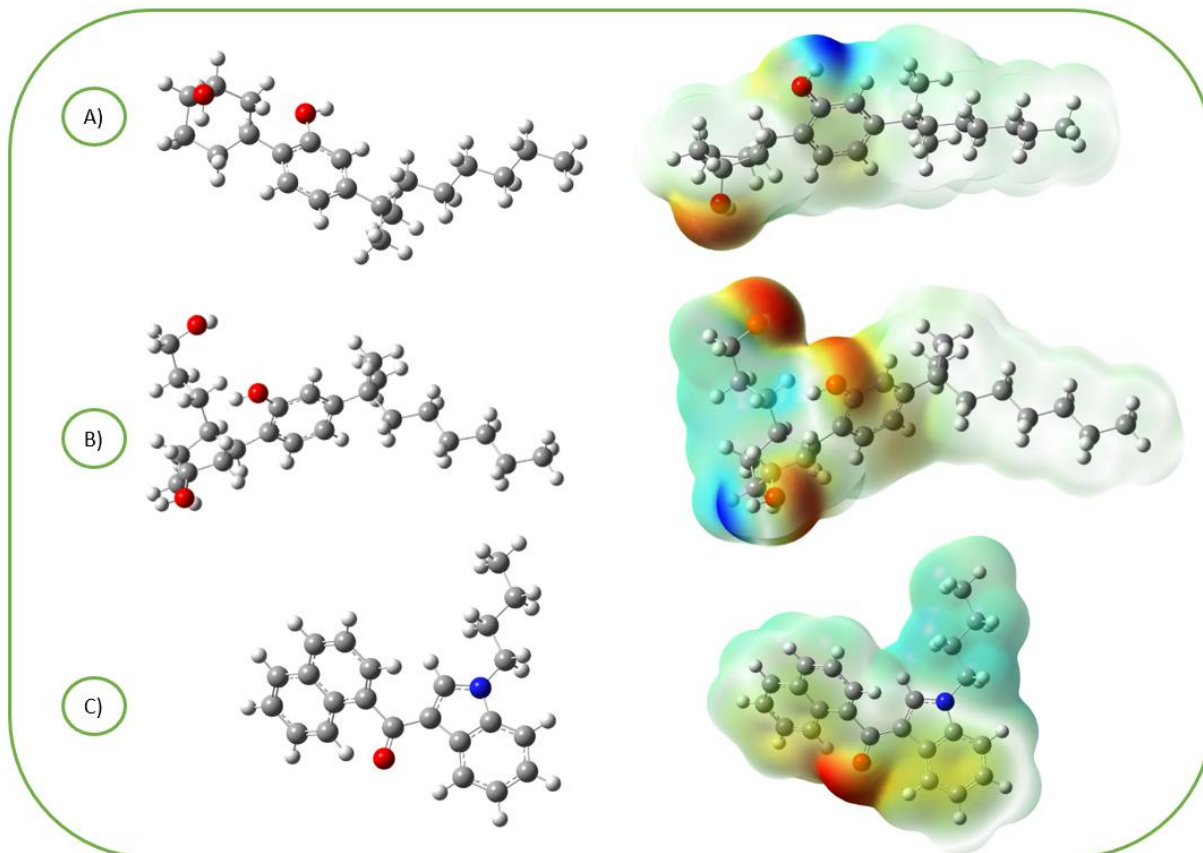


Figura 5: Moléculas optimizadas de los cannabinoides. A) corresponde al CS CP47,497; B) corresponde al CS CP55,940; C) corresponde al CS JWH-073. A la derecha de cada estructura molecular se representa la densidad electrónica de cada cannabinoide.

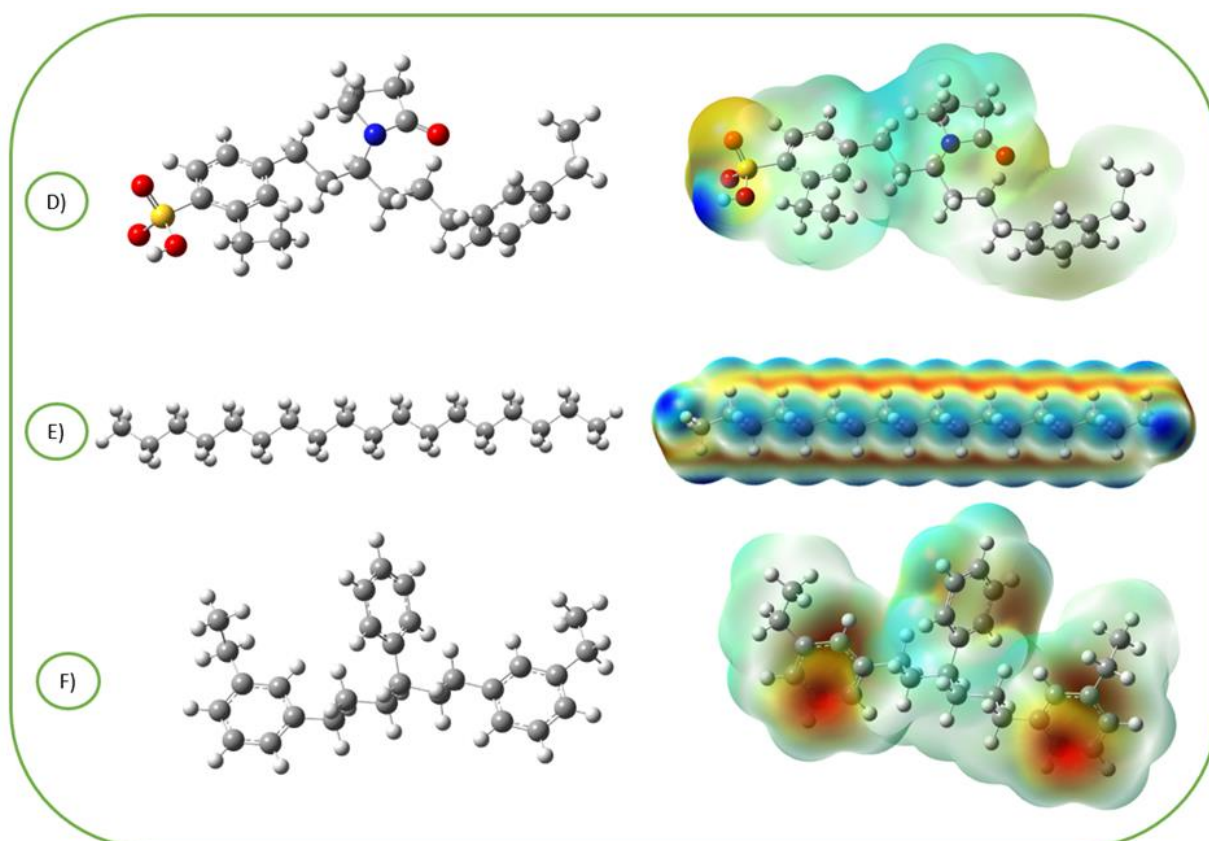


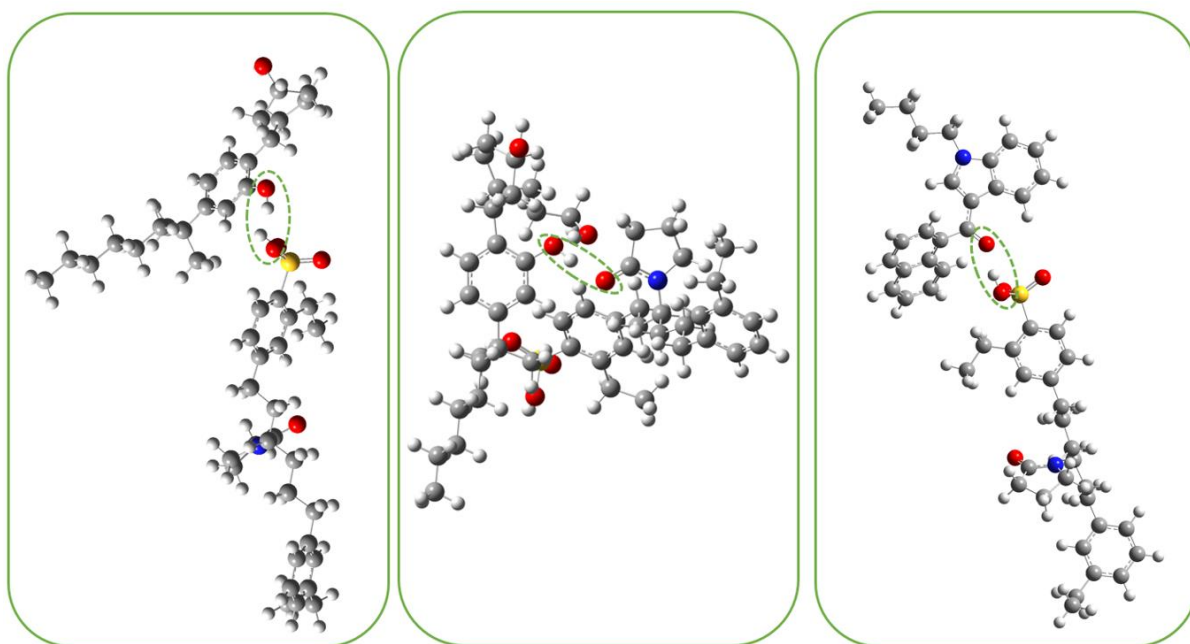
Figura 6: Moléculas optimizadas de los monómeros. D) corresponde al sorbente MCX; E) corresponde al sorbente STRATA-C18; F) corresponde al sorbente STRATA-X. A la derecha de cada molécula se representa la densidad electrónica de cada monómero.

los cartuchos de extracción. A la derecha de cada estructura molecular se representa la densidad electrónica de cada cannabinoide, siendo a mayor carga electrónica mayor colores rojizos, y a menor carga electrónica colores más azulados. A partir de la densidad electrónica y de los grupos funcionales que contienen cada molécula se estudian los tipos de interacciones intermoleculares que se pueden generar en los complejos cannabinoide-monómero: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones tipo  $\pi$ -stacking (entre las nubes  $\pi$  de anillos aromáticos apilados). Una vez formados los complejos se procede al cálculo de las energías de las moléculas por individual y, posteriormente, al cálculo de las energías interacción de los complejos formados, con y sin el error de superposición de bases gracias a la ecuación (6). Es fundamental tener en cuenta el número de moléculas que forman el complejo. Los cálculos se realizan suponiendo que las moléculas están en fase gaseosa, y no en disolución. Esto quiere decir que no se considera que los analitos se encuentren en una disolución de plasma, ya que gracias a estudios previos se ha podido comprobar que no hay un efecto perceptible del disolvente a la hora de obtener la energía de interacción cannabinoide-monómero.<sup>38</sup> A nivel cualitativo los resultados que se obtendrían por ambas vías serían los mismos y el coste computacional se ve reducido. Es por ello por lo que en

este trabajo ya no se atiende a este fenómeno y directamente se estudian los cannabinoides en fase gas.

#### **🚦 Complejos con el cartucho OASIS MCX**

Para el cartucho OASIS MCX las principales interacciones que se estudian y se forman entre los cannabinoides y los monómeros son de tipo enlace de hidrógeno, concretamente entre el grupo OH del grupo sulfónico (tiene elevada densidad electrónica) y los OH de los cannabinoides CP47,497 y el CP55,940. En el caso del cannabinoide JWH-073 la interacción que se establece es



*Figura 7: Esquema de los complejos formados entre los CS y el monómero del cartucho de extracción OASIS MCX. En orden de izquierda a derecha: complejo molecular con el CS CP47,497, seguidamente del complejo con el CS CP55,940 y por último el complejo con el CS JWH-073. La interacción aparece indicada con un círculo con líneas discontinuas.*

entre el grupo amida del monómero de MCX y el grupo carbonilo que posee el CS. En la figura 7 se pueden observar los tipos de interacciones formadas. Este tipo de interacciones se han establecido teniendo en cuenta la densidad electrónica de los grupos funcionales, de tal manera que se han acercado los funcionales de mayor riqueza electrónica a los más débiles en cuanto a abundancia en electrones.

#### **🚦 Complejos con el cartucho STRATA- C18**

El cartucho de Strata-C18 está formado por una base de sílice con cadenas de octadecilo, por lo que se espera que el tipo de interacciones establecidas en los complejos cannabinoide-monómero sean de tipo apolar. Es así que se procede al diseño de los complejos moleculares, formando las interacciones entre las cadenas carbonadas de ambas moléculas, ya que son las zonas más apolares. Además, teniendo en cuenta los grupos funcionales OH y carbonilo de los cannabinoides,

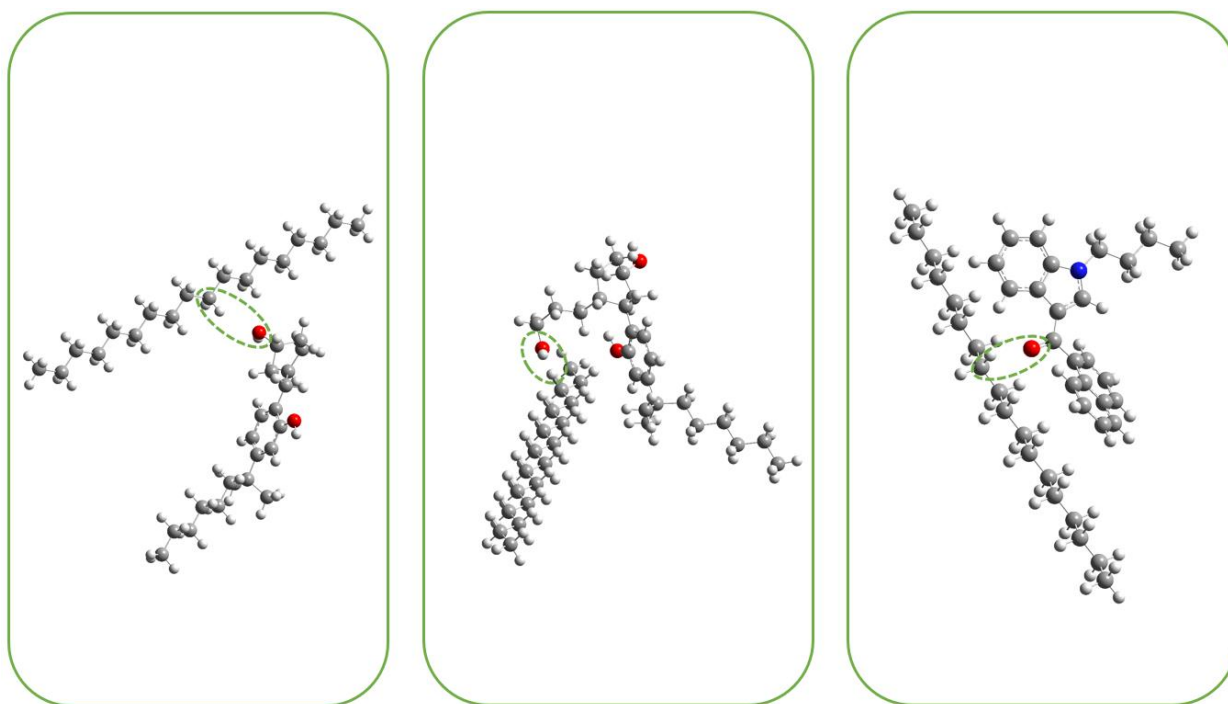
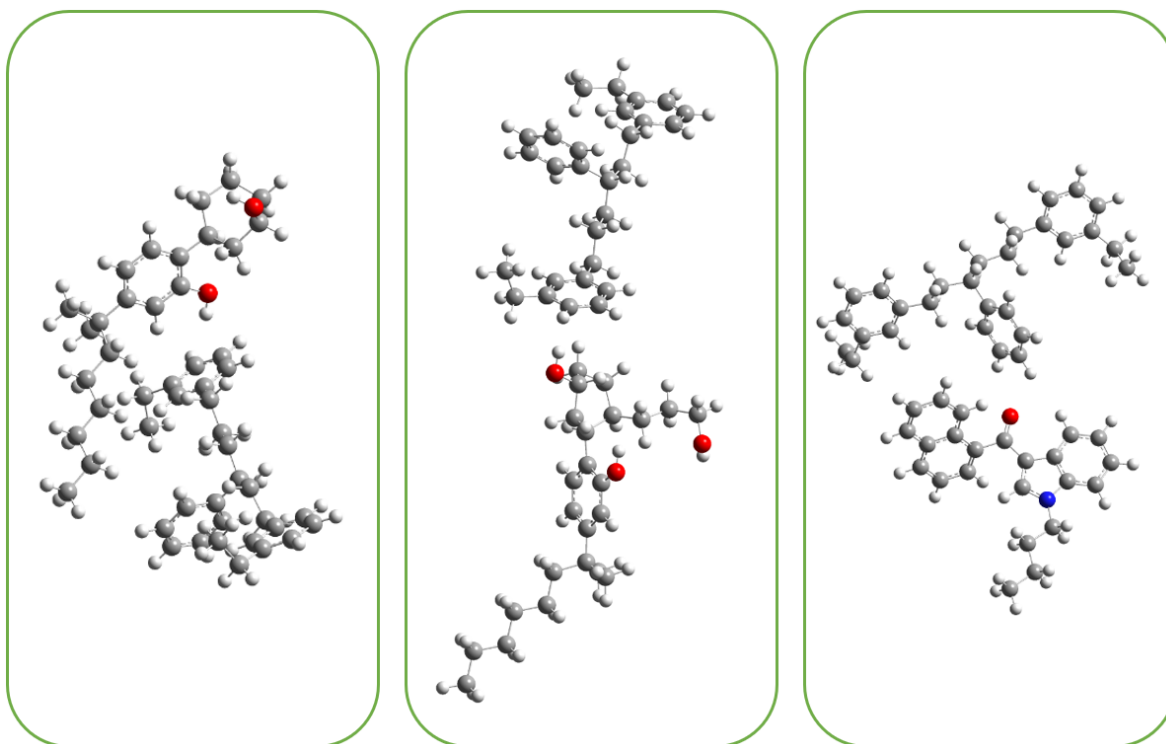


Figura 8: Esquema de los complejos formados entre los CS y el monómero del cartucho de extracción STRATA-C18 con el tipo de interacción 1-C18. En orden de izquierda a derecha: complejo formado con el CS CP47,497, seguidamente del complejo formado con el CS CP55,940 y por último el complejo formado con el CS JWH-073. La interacción aparece indicada con un círculo con líneas discontinuas.

también se estudian las interacciones entre estos grupos y la cadena C18, previamente atendiendo a la distribución de carga de las moléculas que forman los complejos. Es por ello por lo que, para este sorbente se han establecido dos tipos de interacciones: La interacción 1-C18 (Figura 8), en la que se representa una interacción de puentes de hidrógeno entre los grupos alcoholes de los cannabinoides de la familia CP y el oxígeno del grupo carbonilo del JWH con el monómero, y la interacción 2-C18 (Figura 10, Anexos), donde se establecen interacciones entre las cadenas apolares de los cannabinoides con el monómero.

#### Complejos con el cartucho STRATA-X

En caso del monómero que conforma el cartucho de STRATA-X las interacciones varían un poco en función del cannabinoide que vaya a interactuar. Como se puede observar en la figura 6, molécula F), el monómero que conforma este sorbente posee tres anillos aromáticos, lo que puede dar lugar a que se formen interacciones de tipo  $\pi$ -stacking. Por lo tanto, las interacciones que se van a estudiar para este cartucho son: Interacción 1-ST.X, en la cual se hace interaccionar los grupos funcionales OH de los cannabinoides de la familia CP y el oxígeno del grupo carbonilo del JWH-073 con los anillos del monómero y la interacción 2-ST.X-A y la interacción 2-ST.X-B, que solo se ha estudiado con el cannabinoide JWH-073 y donde se aproximan los anillos aromáticos de ambas moléculas para que se establezcan enlaces de tipo  $\pi$ -stacking. En la figura 9 se observa la



*Figura 9: Esquema de los complejos formados entre los CS y el monómero del cartucho de extracción STRATA-X con el tipo de interacción 1-ST.X. En orden de izquierda a derecha: complejo formado con el CS CP47,497, seguidamente del complejo formado con el CS CP55,940 y por último el complejo formado con el CS JWH-073.*

aproximación de los grupos funcionales al centro de los anillos aromáticos del monómero. Debido a cuestiones de efectos estéricos, los cannabinoides de la familia CP interactúan con los anillos de los extremos del monómero, mientras que el JWH-073 interactúa con el anillo del centro del monómero, lo que proporciona que haya más acercamientos entre otras partes de las moléculas. En la figura 11 (Anexos), se pueden observar los otros dos tipos de interacciones del JWH-073 con el monómero (2-ST.X-A y 2-ST.X-B). Además de haber una interacción por apilamiento de los anillos, en forma de sándwich, también se forman interacciones por desplazamiento de planos de los anillos y de configuración tipo T.

## **ENERGÍAS DE INTERACCIÓN**

Por último, una vez formados todos los complejos posibles intentando representar las diferentes interacciones posibles, se prosigue con el cálculo de la energía de interacción de los complejos con y sin la BSSE y se pretende comparar, inicialmente, los resultados obtenidos entre los dos funcionales escogidos, el B3LYP y el M06-2X, en el cartucho de extracción MCX, utilizando como función base el 6-31G\*\*. Seguidamente se cotejan las diferencias entre las energías resultantes de utilizar la corrección BSSE y sin utilizarla y, por último, se contrastan los valores de energías obtenidas para las distintas interacciones formadas en los complejos cannabinoide-monómero. En

Tabla 4: Energías de interacción de los complejos en fase gas en el cartucho MCX, sin corregir y con la corrección BSEE respectivamente, empleando la base la 6-31G\*\*.

CANNABINOIDES	FUNCIONAL	EINT (kcal/mol)	EINT BSSE (kcal/mol)
CP47,497	B3LYP	-10,19	-7,77
	M06-2X	-15,95	-12,40
CP55,940	B3LYP	-19,19	-13,33
	M06-2X	-31,16	-19,12
JWH-073	B3LYP	-13,103	-11,34
	M06-2X	-17,33	-14,75

la tabla 4 se comparan los resultados para los dos funcionales empleados para el cartucho MCX, y se confirma que el resultado cualitativo (es decir, concluir que cannabinoide presenta mayor interacción con el monómero) no difiere significativamente entre uno u otro. Aun así, a nivel cuantitativo si se hayan diferencias, siendo el M06-2X el funcional con el que se obtienen energías más estables. Por eso, para proseguir con el estudio de los cartuchos, inicialmente se utilizará únicamente el funcional el B3LYP y como la función base, el 6-31G\*\*, puesto que es un cálculo mucho menos costoso y más rápido. Pero, para las interacciones más favorables, las más importantes, también se realizará el cálculo con el funcional M06-2X. Si únicamente estudiamos las energías obtenidas para este cartucho, se puede corroborar que la interacción más estable

Tabla 5: Energías de interacción de los complejos en fase gas en el cartucho strata-C18, en función del tipo de interacción formada, sin corregir y con la corrección BSEE respectivamente. Se emplean los funcionales B3LYP y M06-2X y la base la 6-31G\*\*.

CANNABINOIDES	FUNCIONAL	INTERACCIÓN	EINT (kcal/mol)	EINT BSSE (kcal/mol)
CP47,497	B3LYP	1-C18	-2,22	0,16
	M06-2X	1-C18	-3,13	-1,20
	B3LYP	2-C18	-0,23	0,42
CP55,940	B3LYP	1-C18	-2,32	0,69
	M06-2X	1-C18	-4,46	-1,92
	B3LYP	2-C18	-0,42	0,74
JWH-073	B3LYP	1-C18	-2,30	0,99
	M06-2X	1-C18	-6,48	-3,63
	B3LYP	2-C18	-0,757	0,39
	M06-2X	2-C18	-2,03	-1,08

alcanzada es para el cannabinoide CP55,940, que lo convertiría en el CS con mayor capacidad de interacción con el monómero. En la tabla 5 se muestran los datos de energías de interacción de los complejos para el cartucho STRATA-C18. Para las interacciones más importantes se utiliza el

funcional M06-2X. Para el caso del JWH-073 se analizan las dos interacciones con este funcional porque los resultados obtenidos con y sin la BSSE son diferentes. En otras palabras, estudiando el JWH-073 con el funcional B3LYP se obtienen discordancias entre las dos interacciones formadas, comparando las energías con y sin la BSSE. La interacción 1-C18 es más estable sin tener en cuenta la BSSE, pero si tenemos en cuenta es la interacción 2-C18 la más favorable. Como se puede comprobar, las energías obtenidas para este tipo de sorbente son muy débiles. Incluso, a nivel B3LYP se dan complejos menos estables que las moléculas por separado con la corrección BSSE ( $E_{int}$  BSSE positivas). Por eso, también es importante utilizar el M06-2X para estudiar las

*Tabla 6: Energías de interacción de los complejos en fase gas en el cartucho STRATA-X, en función del tipo de interacción formada, sin corregir y con la corrección BSSE respectivamente. Se emplean el funcional B3LYP y M06-2X y la base la 6-31G\*\*.*

CANNABINOIDES	FUNCIONAL	INTERACCIÓN	E <sub>INT</sub> (kcal/mol)	E <sub>INT</sub> BSSE (kcal/mol)
CP47,497	B3LYP	1-ST.X	-5,27	-1,93
	M06-2X	1-ST.X	-8,79	-6,81
CP55,940	B3LYP	1-ST.X	-3,17	-1,72
	M06-2X	1-ST.X	-5,49	-4,24
JWH-073	B3LYP	1-ST.X	-3,78	0,37
	M06-2X	1-ST.X	-12,01	-8,39
	B3LYP	2-ST.X-A	-3,02	-0,29
	M06-2X	2-ST.X-A	-6,28	-4,02
	B3LYP	2-ST.X-B	-3,04	-0,12
	M06-2X	2-ST.X-B	-6,50	-3,97

interacciones más importantes. En la tabla 6, se observan los resultados obtenidos para las energías de los complejos en el cartucho STRATA-X. En este caso, verificando los diferentes tipos de interacciones que se establecieron para los complejos con el JWH-073, el más favorable es el de la interacción 2-ST.X-A. Es decir, para este cannabinoide son más estables las interacciones de tipo  $\pi$ -stacking que las que se forman a partir del grupo carbonilo. Por otra parte, estudiando todas las energías obtenidas, el cannabinoide con la mayor afinidad de interacción con el cartucho de STRATA-X es el CP47,497. Finalmente, si analizamos con detalle todas las energías obtenidas para los tres cartuchos utilizados, se llega a la conclusión de que: el funcional con el que se obtienen mejores resultados es el M06-2X con la función base 6-31G\*\*; el mejor cartucho de extracción es el MCX, pues es el cartucho con el que se consiguen complejos más estables ( $E_{int}$  más negativas) por lo que a la hora de realizar la parte experimental se debería utilizar este cartucho para obtener un mayor rendimiento de extracción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE EXPERIMENTAL

### ○ LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (LOD y LLOQ)

En la tabla 7 se recogen los valores de LOD y LLOQ. Se comprueba que, dependiendo del cannabinoide, se obtienen distintos límites, siendo el CP55,940 el que tiene una menor señal a concentraciones bajas.

Tabla 7: Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) para los CS

CANNABINOIDES	LOD (ppm)	LLOQ (ppm)
CP47,497	0,01	0,02
CP55,940	0,06	0,08
JWH-073	0,01	0,02

### ○ RECTAS DE CALIBRADO

Una vez se han determinado el LLOQ y el LOD de los cannabinoides se procede a elaborar una recta de calibrado por cada cartucho de extracción. Las concentraciones están recogidas en la tabla 3, donde el punto 0 es un blanco que solo contiene el patrón interno en el plasma y el punto 1 es el

Tabla 8: Rectas de calibrado de cada CS para cada cartucho de SPE, junto con el coeficiente de correlación obtenido para cada una de ellas.

Cartuchos SPE	Cannabinoides	Ecuación de la Recta	Cof. correlación
MCX	CP47,497	$y=0,5052x+0,4647$	0,83293
	CP55,940	$y=7,3887x+3,1398$	0,763845
	JWH-073	$y=7,6920x+52,6668$	0,979431
ST-X	CP47,497	$y=0,9857x+0,0195$	0,985204
	CP55,940	$y=0,9197x+0,0549$	0,972535
	JWH-073	$y=10,9950x-0,0559$	0,989984
C-18	CP47,497	$y=1,7424x-0,0099$	0,966926
	CP55,940	$y=1,5094x+0,0945$	0,979886
	JWH-073	$y=1,8597x+0,0697$	0,980114

LLOQ para cada cannabinoide. Se calcula la relación de áreas del analito y el patrón interno y se construyen las rectas de calibrado (tabla 8). Este proceso se lleva a cabo gracias a las herramientas informáticas Excel y Statgraphics Centurion 18. Todas las rectas se han elaborado por duplicado.

### ○ RENDIMIENTO DE LAS SPE

Para la determinación del rendimiento de las extracciones se elige el punto 0,5 ppm para cada cannabinoide y se realiza el proceso de extracción. Los rendimientos obtenidos se recogen en las tablas 9, 10 y 11. Los porcentajes obtenidos no son significativos, ya que no puede haber recuperaciones de extracción del 200%, como ocurre como por ejemplo para el caso del JWH-073

en el cartucho MCX, ni tampoco que se obtengan porcentajes de rendimiento tan bajos, como sucede para el cartucho ST-X. Se estudiaron posibles razones por las que se obtienen estos valores, y se atribuyeron a posibles interferencias causadas por el patrón interno, debido a que se fragmenta de manera similar a los cannabinoides. Para solventar este problema, se procede al estudio de las abundancias sin tener en cuenta el patrón interno, y así poder determinar cual sería

Tabla 10: Rendimientos de extracción obtenidos para el cartucho OASIS MCX.

CARTUCHO OASIS MCX	
Cannabinoides	RENDIMIENTO (%)
CP47,497	495,9114
CP55,940	567,6265
JWH-073	1205,3656

Tabla 11: Rendimientos de extracción obtenidos para el cartucho STRATA-C18.

CARTUCHO STRATA-C18	
Cannabinoides	RENDIMIENTO (%)
CP47,497	19,1735
CP55,940	29,8526
JWH-073	21,7206

Tabla 9 Rendimientos de extracción obtenidos para el cartucho STRATA-X

CARTUCHO STRATA-X	
Cannabinoides	RENDIMIENTO (%)
CP47,497	62,7245
CP55,940	51,8901
JWH-073	297,9232

el mejor cartucho. Estas abundancias se recogen en la tabla 12. Como se puede comprobar, los valores de abundancias resultantes para el cartucho MCX son bastante superiores a los extraídos con los otros dos cartuchos, concluyendo que el cartucho MCX es con el que se obtiene una mejor extracción. Por lo tanto, se considera que el sorbente con el que se realiza una mejor extracción es con el MCX. Por último, si estudiamos todos los resultados obtenidos, tanto a nivel teórico como a nivel experimental, se corrobora que para realizar un tratamiento de muestra adecuado, la extracción en fase sólida ha de realizarse con el cartucho OASIS MCX, ya que se obtienen energías de interacción cannabinoide-monómero más estables y, a nivel de abundancias, es el que aporta unas mayores señales para los tres cannabinoides.

Tabla 12: Abundancias de cada cannabinoide con una concentración de 0,5ppm para cada cartucho de extracción.

Cannabinoides	OASIS MCX	STRATA C18	STRATA-X
CP47,497	3309452	2347620	2027808
CP55,940	18886982	2014899	2301502
JWH-073	12360132	2712787	2094945

## CONCLUSIONES

A nivel teórico:

- Se ha optimizado las geometrías moleculares de los CS y la de los monómeros constituyentes de los cartuchos de extracción.

- Se establece las posibles interacciones entre los complejos formados y se obtuvo que, gracias a los puentes de hidrógeno y los enlaces de tipo  $\pi$ -stacking, se alcanza una mayor estabilidad energética de los complejos.

A nivel experimental:

- Se han optimizado tanto las condiciones cromatográficas necesarias y los protocolos de extracción para poder separar, determinar y cuantificar los 3 CS, por lo que se llegan a obtener qué cartucho es el que obtiene un mayor porcentaje de extracción.

Estudiando conjuntamente ambos tipos de análisis, y teniendo en cuenta el objetivo principal de este trabajo, se llega a la conclusión que el cartucho más adecuado para realizar la SPE es el OASIS MCX, ya que es con el que se obtienen mejores resultados en cuanto a energías de interacción y de abundancias.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Znalezniona, J.; Ginterová, P.; Petr, J.; Ondra, P.; Válka, I.; Ševčík, J.; Chrastina, J.; Maier, V. Determination and Identification of Synthetic Cannabinoids and Their Metabolites in Different Matrices by Modern Analytical Techniques - a Review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *874*, 11–25.
- (2) Coulter, C.; Garnier, M.; Moore, C. Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid. *J. Anal. Toxicol.* **2011**, *35* (7), 424–430.
- (3) Logan, B. K.; Reinhold, L. E.; Xu, A.; Diamond, F. X. Identification of Synthetic Cannabinoids in Herbal Incense Blends in the United States. *J. Forensic Sci.* **2012**, *57* (5), 1168–1180.
- (4) Paul, B. D.; Bosy, T. A Sensitive GC-EIMS Method for Simultaneous Detection and Quantification of JWH-018 and JWH-073 Carboxylic Acid and Hydroxy Metabolites in Urine. *J. Anal. Toxicol.* **2015**, *39* (3), 172–182.
- (5) Hudson, S.; Ramsey, J. The Emergence and Analysis of Synthetic Cannabinoids. *Drug Test. Anal.* **2011**, *3* (7–8), 466–478.
- (6) Sundström, M.; Pelander, A.; Angerer, V.; Hutter, M.; Kneisel, S.; Ojanperä, I. A High-Sensitivity Ultra-High Performance Liquid Chromatography/High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) Method for Screening Synthetic Cannabinoids and Other Drugs of Abuse in Urine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (26), 8463–8474.

- (7) Anzillotti, L.; Marezza, F.; Calò, L.; Andreoli, R.; Agazzi, S.; Bianchi, F.; Careri, M.; Cecchi, R. Determination of Synthetic and Natural Cannabinoids in Oral Fluid by Solid-Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography/Mass Spectrometry: A Pilot Study. *Talanta* **2019**, *201* (April), 335–341.
- (8) *Informe Mundial sobre las Drogas 2019* (publicación de las Naciones Unidas).
- (9) Brime, B.; Llorens, N.; Méndez, F.; Molina, M.; Sánchez, E.; Toratajada, S. INFORME 2020 Alcohol, Tabaco y Drogas Ilegales En España. **2020**.
- (10) Uchiyama, N.; Kawamura, M.; Kikura-Hanajiri, R.; Goda, Y. Identification and Quantitation of Two Cannabimimetic Phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and Four Cannabimimetic Naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as Designer Drugs in Illegal Products. *Forensic Toxicol.* **2011**, *29* (1), 25–37.
- (11) Poole, C. F. New Trends in Solid-Phase Extraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2003**, *22* (6), 362–373.
- (12) Fontanals, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F. New Hydrophilic Materials for Solid-Phase Extraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2005**, *24* (5), 394–406.
- (13) Uhlschmied, C. Evaluation of Commercial Solid-Phase Extraction (SPE) Carrier Materials for the Selective Automated Enrichment of Monoterpenoids and Their Analysis in Cough Drops, Mouthwashes and Bath Additives by Gas- Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). *Open Anal. Chem. J.* **2013**, *7* (1), 12–21.
- (14) Yawney, J.; Treacy, S.; Hindmarsh, K. W.; Burczynski, F. J. A General Screening Method for Acidic, Neutral, and Basic Drugs in Whole Blood Using the Oasis MCX<sup>®</sup> Column. *J. Anal. Toxicol.* **2002**, *26* (6), 325–332.
- (15) Huq, S.; Dixon, A.; Kelly, K.; Kallury, K. M. R. Novel Solid-Phase Extraction Protocol for 11-nor-9-Carboxy-  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol from Urine Samples Employing a Polymeric Mixed-Mode Cation-Exchange Resin, Strata-X-C, Suitable for Gas Chromatography-Mass Spectrometry or Liquid Chromatography-Mass Spec. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073* (1–2), 355–361.
- (16) Carlin, M. G.; Dean, J. R. *Forensic Applications of Gas Chromatography*; O'Hare, S., Carlin, M. G., Eds.; CRC Press: New York, 2013.

- (17) Dettmer-Wilde, K.; Engewald, W.; Adahchour, M.; de Zeeuw, J.; Albrecht, U. V.; Andersson, J. T.; Baier, H.-U.; Bicchi, C.; Biedermann, M.; Brinkman, U. A. T.; Cagliero, C.; Cordero, C.; Fragner, L.; Furuhashi, T.; Gruber, M. A.; Jochmann, M. A.; Juza, M.; Laaks, J.; Liberto, E.; Mattusch, J.; Moeder, M.; Mothes, S.; Ohtani, H.; Ramos, L.; Rohn, S.; Rotzsche, H.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Schmidt, T. C.; Schultze, P.; Schurig, V.; Teske, J.; Trapp, O.; Tsuge, S.; Weckwerth, W. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*; Dettmer-Wilde, K., Engewald, W., Eds.; Springer, 2014.
- (18) Wudy, S.; Homoki, J.; Teller, W. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*; Niessen, W. M., Ed.; Marcel Dekker Incorporation, 2001.
- (19) Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. GC y GC-MS : Configuración Del Equipo versus Aplicaciones. *Sci. Chromatogr.* **2010**, *2* (3), 33–59.
- (20) Kitson, F. G.; Larsen, B. S.; McEwen, C. N. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide.*, Second.; Elsevier Incorporation, 2011.
- (21) Koch, W.; Holthausen, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Second.; Wiley-VCH: Frankfurt, 2001.
- (22) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*, Second.; John Wiley & Sons Ltd, 2004.
- (23) Levine, I. N. *Química Cuántica*, Quinta.; Prentice Hall: Brooklyn, 2001; Vol. 44.
- (24) San Fabián, E. *Cálculos Computacionales de Estructuras Moleculares*; Alicante, 2020.
- (25) Kaplan, I. G. *Intermolecular Interactions: Physical Picture, Computational Methods and Model Potentials*; 2006. <https://doi.org/10.1002/047086334X>.
- (26) Foresman, J. B.; Frisch, Ae. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, Third.; Gaussian Incorporation, 2015.
- (27) Borges, R. S.; Batista, J.; Viana, R. B.; Baetas, A. C.; Orestes, E.; Andrade, M. A.; Honório, K. M.; Da Silva, A. B. F. Understanding the Molecular Aspects of Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol as Antioxidants. *Molecules* **2013**, *18* (10), 12663–12674.
- (28) De Castro, J. S.; Rodrigues, C. H. P.; Bruni, A. T. In Silico Infrared Characterization of Synthetic Cannabinoids by Quantum Chemistry and Chemometrics. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60* (4), 2100–2114.

- (29) Ernst, L.; Brandhorst, K.; Papke, U.; Altrogge, A.; Zodel, S.; Langer, N.; Beuerle, T. Identification and Quantification of Synthetic Cannabinoids in 'Spice-like' Herbal Mixtures: Update of the German Situation in Early 2017. *Forensic Sci. Int.* **2017**, *277*, 51–58.
- (30) Cooman, T.; Santos, H.; Cox, J.; Filho, J. F. A.; Borges, K. B.; Romão, W.; Arroyo-Mora, L. E. Development, Validation and Evaluation of a Quantitative Method for the Analysis of Twenty-Four New Psychoactive Substances in Oral Fluid by LC–MS/MS. *Forensic Chem.* **2020**, *19*, 100231.
- (31) Rad, S. S.; Dalali, N.; Baheri, T. Combination of Magnetic Solid-Phase Extraction with Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by GC-MS for Trace Analysis of Synthetic Cannabinoids in Plasma Samples. *Micro Nano Lett.* **2020**, *15* (8), 545–549.
- (32) Mascini, M.; Montesano, C.; Perez, G.; Wang, J.; Compagnone, D.; Sergi, M. Selective Solid Phase Extraction of JWH Synthetic Cannabinoids by Using Computationally Designed Peptides. *Talanta* **2017**, *167* (November 2016), 126–133.
- (33) Borova, V. L.; Gago-Ferrero, P.; Pistos, C.; Thomaidis, N. S. Multi-Residue Determination of 10 Selected New Psychoactive Substances in Wastewater Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2015**, *144*, 592–603.
- (34) Hess, C.; Murach, J.; Krueger, L.; Scharrenbroch, L.; Unger, M.; Madea, B.; Sydow, K. Simultaneous Detection of 93 Synthetic Cannabinoids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Retrospective Application to Real Forensic Samples. *Drug Test. Anal.* **2017**, *9* (5), 721–733.
- (35) Dowling, G.; Regan, L. A Method for CP 47, 497 a Synthetic Non-Traditional Cannabinoid in Human Urine Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879* (3–4), 253–259.
- (36) Pandopulos, A. J.; Bade, R.; O'Brien, J. W.; Tscharke, B. J.; Mueller, J. F.; Thomas, K.; White, J. M.; Gerber, C. Towards an Efficient Method for the Extraction and Analysis of Cannabinoids in Wastewater. *Talanta* **2020**, *217* (February), 121034.
- (37) Protti, M.; Rudge, J.; Sberna, A. E.; Gerra, G.; Mercolini, L. Dried Haematic Microsamples and LC–MS/MS for the Analysis of Natural and Synthetic Cannabinoids. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1044–1045*, 77–86.

- (38) Peña-Gallego, Á.; Rodríguez- Otero, J.; Cabaleiro-Lago, E. Computational Study of the Interactions of Cocaine and Benzoylecgonine with Methacrylic Acid in Molecularly Imprinted Polymers (MIPS), (doi:10.3390/ecsoc-16-01059).

## ANEXOS

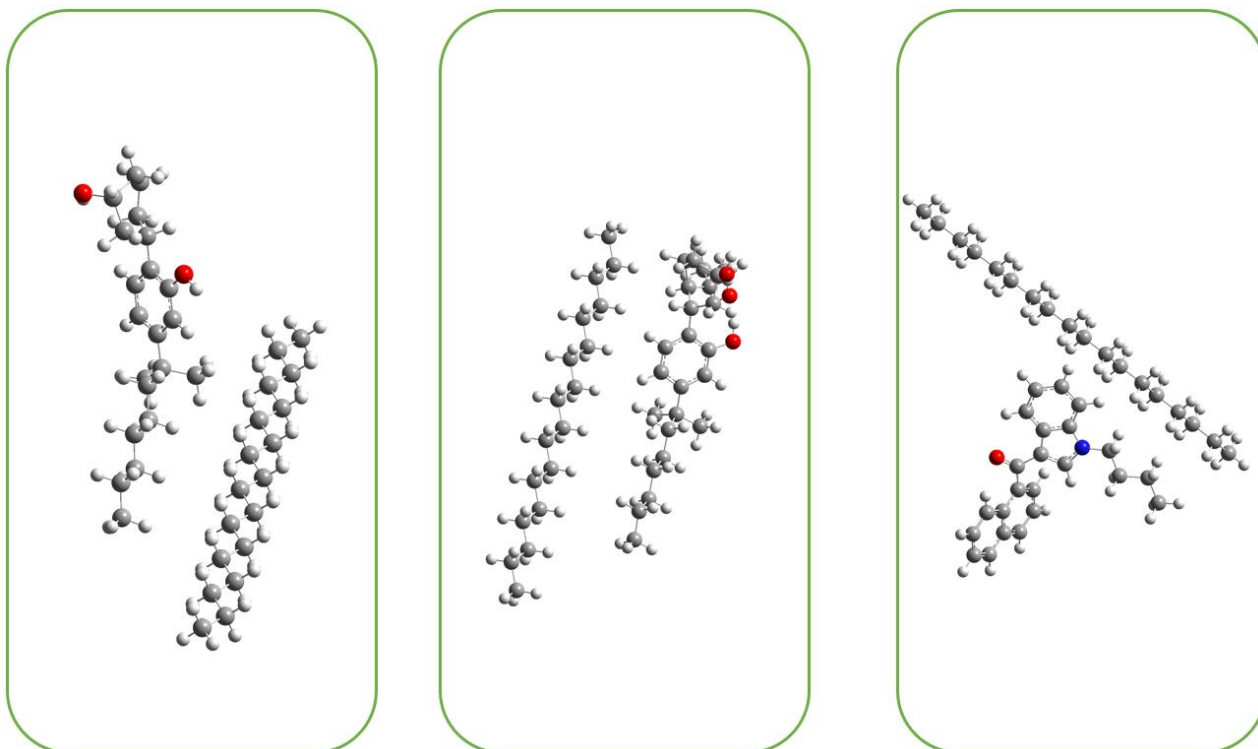


Figura 10: Esquema de los complejos formados entre los CS y el monómero del cartucho de extracción STRATA-C18 con el tipo de interacción 2-C18. En orden de izquierda a derecha: complejo formado con el CS CP47,497, seguidamente del complejo formado con el CS CP55,940 y por último el complejo formado con el CS JWH-073.

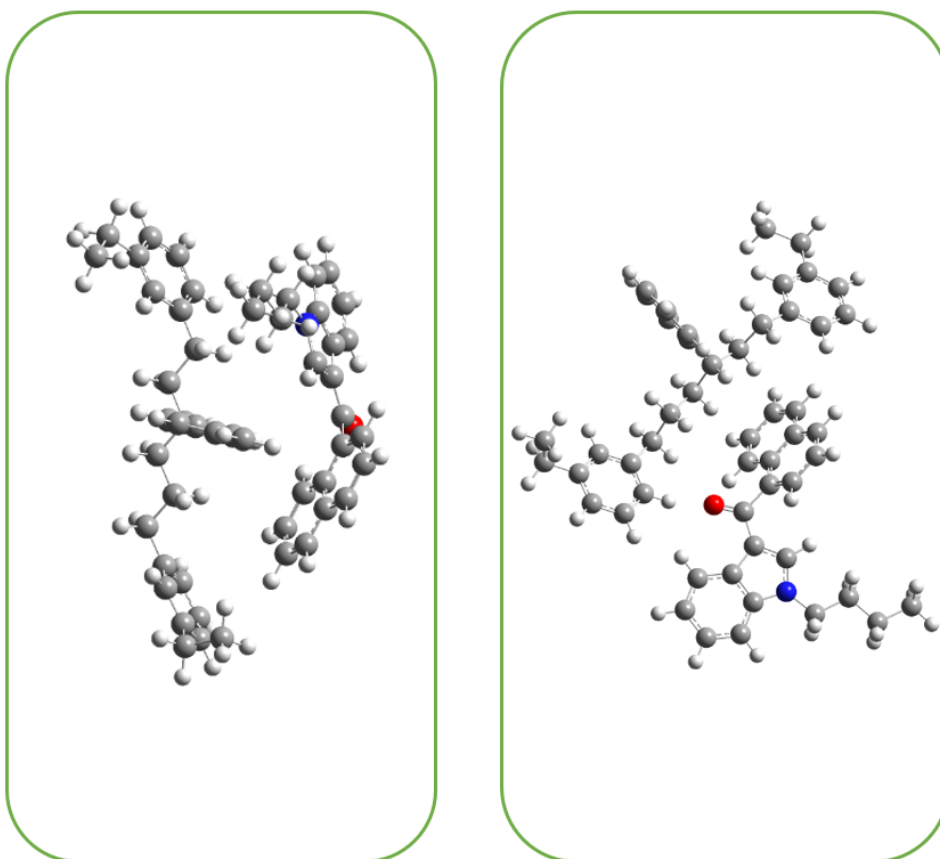


Figura 11: Esquema de los complejos formados entre el JWH-073 y el monómero del cartucho de extracción STRATA-X con las interacciones 2-ST.X-A y 2-ST.X-B, respectivamente.